

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 096 013 A2**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
02.05.2001 Patentblatt 2001/18

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/53**, C12N 9/02,  
C12P 13/08

(21) Anmeldenummer: **00122505.1**

(22) Anmeldetag: **14.10.2000**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **28.10.1999 DE 19951975**

(71) Anmelder: **Degussa AG**  
**40474 Düsseldorf (DE)**

(72) Erfinder:

- Möckel, Bettina, Dr.  
40597 Düsseldorf (DE)

- Weissenborn, Anke  
72076 Tübingen (DE)
- Pfefferle, Walter, Dr.  
33790 Halle (Westf.) (DE)
- Pühler, Alfred, Prof.  
33739 Bielefeld (DE)
- Kalinowski, Jörn, Dr.  
33615 Bielefeld (DE)
- Bathe, Brigitte, Dr.  
33154 Salzkotten (DE)
- Dusch, Nicole, Dr.  
33619 Bielefeld (DE)

(54) **Corynebacterium poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen, und die Verwendung zur Herstellung von L-Lysin**

(57) Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren durch Abschwächung des poxB-Gens.

**EP 1 096 013 A2**

## Beschreibung

**[0001]** Gegenstand der Erfindung sind für das *poxB*-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin durch Abschwächung des *poxB*-Gens.

## Stand der Technik

**[0002]** L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

**[0003]** Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

**[0004]** Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

**[0005]** Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

## Aufgabe der Erfindung

**[0006]** Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

**[0007]** L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

**[0008]** Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

**[0009]** Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

[0010] Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

5 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, Punkt d insbesondere pCR2.1poxBint, hinterlegt in E.coli DSM 13114

10

und als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die in dem pox-Gen eine Insertion oder Deletion enthalten.

[0011] Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

[0012] Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Pyruvat-Oxidase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Pyruvat-Oxidase Gens aufweisen.

[0013] Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Pyruvat-Oxidase codieren.

[0014] Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Basen.

[0015] „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

[0016] „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

[0017] Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

[0018] Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen das Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Pyruvat-Oxidase und auch solche ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

[0019] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren, insbesondere L-Lysin produzieren und in denen die für das poxB-Gen codierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

[0020] Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0021] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

[0022] Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870

55 *Corynebacterium melassecola* ATCC17965

*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539

*Brevibacterium flavum* ATCC14067

*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und

*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

5 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709  
*Brevibacterium flavum* FERM-P 1708  
*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463  
10 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 und  
*Corynebacterium glutamicum* DSM 5714 Den Erfindern

gelang es, das neue, für das Enzym Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende *poxB*-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

15 **[0023]** Zur Isolierung des *poxB*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (*Cell* 50, 495 - 508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326, 1992) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (*The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid Biosynthetic Genes from Corynebacterium glutamicum*. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997) beschreibt die Klonierung von *C. glutamicum* Genen unter Verwendung des von Short et al. (*Nucleic Acids Research*, 16: 7583) beschriebenen  $\lambda$  Zap Expressionssysteme.

30 **[0024]** Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, *Life Sciences*, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, *Gene*, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$  (Jeffrey H. Miller: *A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

35 **[0025]** Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

**[0026]** Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA*, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

40 **[0027]** Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217-232(1986)), dem GCG-Programm von Butler (*Methods of Biochemical Analysis* 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85,2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (*Nature Genetics* 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

45 **[0028]** Auf diese Weise wurde die neue für das *poxB*-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *poxB*-Genproduktes dargestellt.

50 **[0029]** Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben.

**[0030]** Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (*International Journal of Systematic Bacteriology* (1991) 41: 255-

260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

[0031] Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des *poxB*-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin produzieren.

[0032] Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des *poxB*-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0033] Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

[0034] Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0035] Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnsmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnsmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations) in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0036] Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen eine Insertionsmutagenese des *poxB*-Gens durchgeführt werden kann, ist pCR2.1poxBint (Figur 1).

[0037] Plasmid pCR2.1poxBint besteht aus dem von Mead et al. (Bio/Technology 9:657-663 (1991)) beschriebenen Plasmid pCR2.1-TOPO, in das ein internes Fragment des *poxB*-Gens, dargestellt in SEQ-ID No. 3, eingebaut wurde. Dieses Plasmid führt nach Transformation und homologer Rekombination in das chromosomale *poxB*-Gen (Insertion) zu einem Totalverlust der Enzymfunktion. Auf diese Weise wurde beispielhaft der Stamm DSM5715::pCR2.1poxBint hergestellt, dessen Pyruvat-Oxidase ausgeschaltet ist. Weitere Anleitungen und Erläuterungen zur Insertionsmutagenese findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9,84-87 (1991)) oder Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)).

[0038] Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *poxB*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

[0039] So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende *dapA*-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- gleichzeitig das für die Tetrahydrodipicolinat Succinylase kodierende *dapD* Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)), oder
- gleichzeitig das Gen für die Succinylidiaminopimelate-Desuccinylase kodierende *dapE* Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)), oder
- gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende *gap*-Gen (Eikmanns (1992). Jour-

nal of Bacteriology 174:6076-6086), oder

- gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen(Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)), oder
- gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

**[0040]** Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des poxB-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanz, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

**[0041]** Die das Polynukleotid gemäß Anspruch 1 enthaltenden Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

**[0042]** Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

**[0043]** Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

**[0044]** Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

**[0045]** Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm DH5 $\alpha$ /pCR2.1poxBint als DSM 13114.

## Beispiele

**[0046]** Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

## 5 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

**[0047]** Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, 10 Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Rache Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the 15 National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf 20 diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank 25 wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

## Beispiel 2

30

Isolierung und Sequenzierung des *poxB*-Gens

**[0048]** Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, 35 Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Gron- 40 ingen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsge- 45 misch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5αMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences 50 U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

**[0049]** Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit

den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

[0050] Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1737 Basenpaaren, welches als poxB-Gen bezeichnet wurde. Das poxB-Gen kodiert für ein Polypeptid von 579 Aminosäuren.

### Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des poxB-Gens

[0051] Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Elkmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des poxB-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt:

poxBint1:  
5' TGC GAG ATG GTG AAT GGT GG 3'  
poxBint2:  
5' GCA TGA GGC AAC GCA TTA GC 3'

[0052] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein ca. 0,9 kb großen DNA-Fragment isoliert, welches ein internes Fragment des poxB-Gens trägt und in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

[0053] Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

[0054] Anschließend wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1poxBint genannt.

### Beispiel 4

Integrationsmutagenese des poxB-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

[0055] Der in Beispiel 2 genannte Vektor pCR2.1poxBint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in *Corynebacterium glutamicum* DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1poxBint kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1poxBint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Für den Nachweis der Integration wurde das poxBint Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Elkmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen Sall, SacI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1poxBint hatte innerhalb des chromosomalen poxB-Gens ins Chromosom von DSM5715 inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1poxBint bezeichnet.



## Beispiel 5

## Herstellung von Lysin

5 [0056] Der in Beispiel 3 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM5715::pCR2.1poxBint wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

10 [0057] Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 48 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM	
CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

40 [0058] CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

[0059] Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

45 [0060] Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

[0061] In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	13,1	9,5
DSM5715::pCR2.1poxBint	12,5	12,9

## Beispiel 6

## Integrationsmutagenese des poxB-Gens in dem Valinproduzenten FERM-BP 1763

- 5 **[0062]** Der in Beispiel 2 genannte Vektor pCR2.1poxBint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in *Brevibacterium lactofermentum* FERM-BP 1763 elektroporiert. Bei dem Stamm FERM-BP 1763 handelt es sich um einen Mycophenolsäure-resistenten Valin-Produzenten (US-A-5,188,948). Der Vektor pCR2.1poxBint kann in FERM-BP 1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von FERM-BP 1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromo-
- 10 som Integriertem pCR2.1poxBint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Für den Nachweis der Integration wurde das poxBint Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA
- 15 eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen Sall, SacI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1poxBint hatte innerhalb des chromosomalen poxB-Gens ins Chromosom von FERM-BP 1763 inseriert. Der Stamm wurde als FERM-BP 1763::pCR2.1poxBint bezeichnet.

## Beispiel 7

## Herstellung von Valin

- 25 **[0063]** Der in Beispiel 6 erhaltene *B. lactofermentum* Stamm FERM-BP 1763::pCR2.1poxBint wurde in einem zur Produktion von Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.
- [0064]** Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 48 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert.
- 30 **[0065]** Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM	
CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Isoleucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Methionin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

[0066] CSL (Corn Steep Liquor), MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

[0067] Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

[0068] Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

[0069] In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin-HCl g/l
FERM-BP 1763	8,6	12,1
FERM-BP 1763::pCR2.1poxBint	9,5	13,0

[0070] Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1poxBint.

[0071] Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmids ColE1

lacZ: 5'Ende des  $\beta$ -Galactosidase Gens

f1 ori: Replikationsursprung des Phagen f1

**EP 1 096 013 A2**

KmR: Kanamycin Resistenz

ApR: Ampicillin Resistenz

5 BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys BamHI

EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzymys EcoRI

poxBint: internes Fragment des poxB-Gens

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

&lt;120&gt; Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 990159 BT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (327)..(2063)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; -35\_signal

&lt;222&gt; (227)..(232)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; -10\_signal

&lt;222&gt; (256)..(261)

&lt;400&gt; 1

```

ttagaggcga ttctgtgagg tcactttttg tggggtcggg gtctaaattt ggccagtttt 60
cgaggcgacc agacaggcgt gcccacgatg tttaaataagg cgatcgggtg gcatctgtgt 120
ttggtttcga cgggctgaaa ccaaaccaga ctgccagca acgacggaaa tcccaaaagt 180
gggcatccct gtttggtacc gagtaccac ccgggcctga aactccctgg caggcgggcg 240
aagcgtggca acaactggaa tttaagagca caattgaagt cgcaccaagt taggcaacac 300
aatagccata acgttgagga gttcag atg gca cac agc tac gca gaa caa tta 353
                               Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu
                               1                               5

att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg 401
Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val
10                               15                               20                               25

ggt gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att 449
Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile
30                               35                               40

gag tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt gca gcc ggt 497
Glu Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly
45                               50                               55

```

EP 1 096 013 A2

5  
 gcg gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt 545  
 Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys  
 60 65 70

10  
 ggt cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga 593  
 Gly Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg  
 75 80 85

15  
 aat ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag 641  
 Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln  
 90 95 100 105

20  
 att ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag 689  
 Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys  
 110 115 120

25  
 gaa tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa 737  
 Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu  
 125 130 135

30  
 cgc att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt aaa ggt gtg 785  
 Arg Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val  
 140 145 150

35  
 tcg gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac 833  
 Ser Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp  
 155 160 165

40  
 ggt act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc 881  
 Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe  
 170 175 180 185

45  
 ccg gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct 929  
 Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala  
 190 195 200

50  
 aag tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg 977  
 Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala  
 205 210 215

55  
 cag gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg 1025  
 Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala  
 220 225 230

60  
 ctg ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc 1073  
 Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly  
 235 240 245

65  
 atg tct ggc ctg ctt ggt tac ggc qcc tgc gtg gat gcg tcc aat gag 1121  
 Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu  
 250 255 260 265

70  
 gcg gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc 1169  
 Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe  
 270 275 280

75  
 ctt cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gcg cac att 1217  
 Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile  
 285 290 295

EP 1 096 013 A2

5	ggt cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala 300 305 310	1265
10	aca atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser 315 320 325	1313
15	ttc ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val 330 335 340 345	1361
20	gta gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct Val Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro 350 355 360	1409
25	gaa tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val 365 370 375	1457
30	ttt act gtg gat acc ggc atg tgc aat gtg tgg cat gcg agg tac atc Phe Thr Val Asp Thr Gly Met Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile 380 385 390	1505
35	gag aat ccg gag gga acg cgc gac ttt gtg ggt tca ttc cgc cac ggc Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly 395 400 405	1553
40	acg atg gct aat gcg ttg cct cat gcg att ggt gcg caa agt gtt gat Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp 410 415 420 425	1601
45	cga aac cgc cag gtg atc gcg atg tgt ggc gat ggt ggt ttg ggc atg Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met 430 435 440	1649
50	ctg ctg ggt gag ctt ctg acc gtt aag ctg cac caa ctt ccg ctg aag Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys 445 450 455	1697
55	gct gtg gtg ttt aac aac agt tct ttg ggc atg gtg aag ttg gag atg Ala Val Val Phe Asn Asn Ser Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met 460 465 470	1745
60	ctc gtg gag gga cag cca gaa ttt ggt act gac cat gag gaa gtg aat Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn 475 480 485	1793
65	ttc gca gag att gcg gcg gct gcg ggt atc aaa tcg gta cgc atc acc Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr 490 495 500 505	1841
70	gat ccg aag aaa gtt cgc gag cag cta gct gag gca ttg gca tat cct Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro 510 515 520	1889

5 gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg ctg tcg atc 1937  
 Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile  
 525 530 535

cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc aag gcg gcc 1985  
 Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala  
 540 545 550

10 acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc gat ctg gcc 2033  
 Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala  
 555 560 565

15 cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tgatgattga tacacctgct 2083  
 Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro  
 570 575

gttctcattg accgcgagcg cttaactgcc aacattttcca ggatggcagc tcacgccggt 2143  
 gcccatgaga ttgccct 2160

20 <210> 2  
 <211> 579  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

25 <400> 2  
 Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln  
 1 5 10 15

30 Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile  
 20 25 30

Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn  
 35 40 45

35 Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly  
 50 55 60

Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu  
 65 70 75 80

40 Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala  
 85 90 95

Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln  
 100 105 110

45 Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu  
 115 120 125

Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile  
 130 135 140

50 Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly  
 145 150 155 160

55



Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr  
 165 170 175  
 5 Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala  
 180 185 190  
 Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys  
 195 200 205  
 10 Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu  
 210 215 220  
 Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile  
 225 230 235 240  
 15 Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr  
 245 250 255  
 Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu  
 260 265 270  
 20 Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala  
 275 280 285  
 Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys  
 290 295 300  
 25 Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro  
 305 310 315 320  
 His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys  
 325 330 335  
 30 Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val Val Glu Thr Tyr Thr His Asn  
 340 345 350  
 Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu  
 355 360 365  
 35 Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val Phe Thr Val Asp Thr Gly Met  
 370 375 380  
 Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg  
 385 390 395 400  
 40 Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro  
 405 410 415  
 His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala  
 420 425 430  
 45 Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr  
 435 440 445  
 Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys Ala Val Val Phe Asn Asn Ser  
 450 455 460  
 50 Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu  
 465 470 475 480  
 55

Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala  
 485 490 495  
 5 Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu  
 500 505 510  
 Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile  
 515 520 525  
 10 Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu  
 530 535 540  
 Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly  
 545 550 555 560  
 15 Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile  
 565 570 575  
 20 Pro Thr Pro  
 25 <210> 3  
 <211> 875  
 <212> DNA  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*  
 <400> 3  
 30 tgcgagatgg tgaatggtgg tgagcagggt gaacgcattt tgcatacagc gattcagttcc 60  
 accatggcgg gtaaaagggtgt gtcgggtggt gtgattcctg gtgatatcgc taaggaagac 120  
 gcagggtgacg gtacttattc caattccact atttcttctg gcactcctgt ggtgttcccg 180  
 gatcctactg aggctgcagc gctggtggag gcgattaaca acgctaagtc tgtcactttg 240  
 ttctgcgggtg cgggcgtgaa gaatgctcgc gcgcagggtg tggagttggc ggagaagatt 300  
 35 aaatcaccca tcgggcatgc gctgggtggt aagcagtaca tccagcatga gaatccgttt 360  
 gaggtcggca tgtctggcct gcttggttac ggccgctgcg tggatgcgtc caatgaggcg 420  
 gatctgctga ttctattggg tacggatttc ccttattctg atttccctcc taaagacaac 480  
 gttgcccagg tggatatcaa cgggtgcgcac attggtcgac gtaccacggt gaagtatccg 540  
 gtgaccgggtg atgttgctgc aacaatcgaa aatattttgc ctcatgtgaa ggaaaaaaca 600  
 40 gatcgttcct tccttgatcg gatgctcaag gcacacgagc gtaagttgag ctcggtggta 660  
 gagacgtaca cacataacgt cgagaagcat gtgcctattc accctgaata cgttgccctct 720  
 attttgaacg agctggcgga taaggatgcg gtgtttactg tggataccgg catgtgcaat 780  
 gtgtggcatg cgaggtacat cgagaatccg gagggaaacg gcgactttgt ggggttcattc 840  
 cgccacggca cgaaggctaa tgcgttgccct catgc 875  
 45

# Patentansprüche

## 1. Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
- 5
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1,  
wobei das Polynukleotid eine replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
- 10
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2,  
enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
- 15
5. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,  
enthaltend
- 20
- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder
- 25
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutanten in (i)
- 30
7. Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere Punkt d, hinterlegt in E.coli, DSM 13114.
8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die eine Deletion oder eine Insertion in dem poxB-Gen enthalten.
- 35
9. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man folgende Schritte durchführt,
- 40
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das poxB-Gen abschwächt,  
b) Anreicherung des gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und  
c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**
- 45
- daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**
- 50
- daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**
- 55
- daß man die Expression des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c verringert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**

daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymproteins) herabsetzt, für das das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c codiert.

- 5 14. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zur Abschwächung die Integrationsmutagenese mittels des Plasmids pCR2.1poxBint, dargestellt in Figur 1 und hinterlegt als DSM 13114, oder eines seiner Bestandteile verwendet.
- 10 15. Verfahren gemäß Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere Gene überexprimiert, ausgewählt aus der Gruppe
- 15 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen,
  - das die S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelnde DNA-Fragment,
  - das die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
  - 20 • das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende dapE Gen
  - das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende dap-Gen
  - das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen
  - 25 • das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen.
- 30 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium glutamicum einsetzt.

Figur 1: Plasmidkarte pCR2.1poxBint



